

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

13.01.00

09/889324

03 MAR 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 8月12日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第228282号

出願人

Applicant(s):

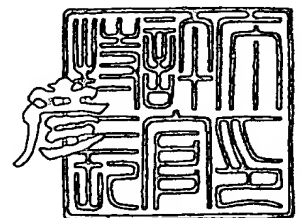
科学技術振興事業団

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特2000-3007032

【書類名】 特許願

【整理番号】 A031P43

【提出日】 平成11年 8月12日

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願  
特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願  
特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東6-17-18-202

    【氏名】 審良 静男

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東5-5-〇棟202

    【氏名】 竹田 潔

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

    【代表者】 中村 守孝

【代理人】

    【識別番号】 100107984

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【先の出願に基づく優先権主張】

    【出願番号】 平成11年特許願第 7365号

    【出願日】 平成11年 1月14日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌細胞壁成分不応答性モデルマウス

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする細菌細胞壁成分不応答性の非ヒト動物。

【請求項 2】 細菌細胞壁成分が、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンであることを特徴とする請求項 1 記載の非ヒト動物。

【請求項 3】 細菌細胞壁成分が、グラム陽性菌の細胞壁成分であることを特徴とする請求項 1 記載の非ヒト動物。

【請求項 4】 グラム陽性菌の細胞壁成分が、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン、リポテイコ酸又は結核菌溶解物であることを特徴とする請求項 3 記載の非ヒト動物。

【請求項 5】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 4 記載の非ヒト動物。

【請求項 6】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 5 記載の非ヒト動物。

【請求項 7】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 8】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 9】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 8 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 1 0】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物の野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 1 1】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と

該非ヒト動物の野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 1 2】 骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物の野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 8 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 1 3】 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 7 ～ 1 2 のいずれか記載の被検物質の評価方法。

【請求項 1 4】 細菌細胞壁成分に対して不応答性であることを特徴とするノックアウトマウス。

【請求項 1 5】 細菌細胞壁成分が、グラム陽性菌の細胞壁成分であることを特徴とする請求項 1 4 記載のノックアウトマウス。

【請求項 1 6】 細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノックアウトマウスに被検物質を投与して、該被検物質中の細菌細胞壁成分を検出することを特徴とする細菌細胞壁成分の検出方法。

【請求項 1 7】 細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノックアウトマウスと野生型マウスに被検物質を投与して、該被検物質中の細菌細胞壁成分を検出することを特徴とする細菌細胞壁成分の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細菌細胞壁成分に対して不応答性である骨髓細胞分化初期応答 (myeloid differentiation primary response; 以下「My D 8 8」という) 遺伝子機能が欠損した非ヒト動物、特にMy D 8 8 ノックアウトマウス及びこれを用いた被検物質のエンドトキシン活性、インターロイキン-1 活性、インターロイキン-1 8 活性等の評価方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

免疫反応や感染時の応答、造血、ウイルス感染や腫瘍細胞の障害に重要な役割を果たしている細胞間シグナル伝達物質であるサイトカインの中でも、リンパ球

間でシグナルを伝え合うサイトカインはインターロイキン（以下「IL」という）と呼ばれている。このILの中で、IL-1は、様々な免疫反応や炎症反応を介しているサイトカインであり、生体の恒常性維持に関与し、感染時や傷を受けた際に単球、マクロファージ、ケラチノサイト、血管内皮細胞等種々の細胞から産生される。IL-1には、同一のレセプターに結合するIL-1 $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の2種類が存在することが知られている。また、IL-1は、T細胞の抗原やマイトジェンによる活性化の際に同時に働き、T細胞からIL-2を分泌させIL-2レセプターの発現を増強してT細胞の増殖を誘導することや、単球やマクロファージに作用しTNF、IL-1、IL-6の産生を誘導することも知られている。

#### 【0003】

IL-1には、その受容体である2種類のIL-1レセプター（以下「IL-1R」という）があり、タイプI及びタイプIIのどちらのIL-1Rもイムノグロブリン様ドメインが細胞外ドメインに3カ所存在し、タイプIレセプターはT細胞や結合組織で、タイプIIレセプターは脾臓B細胞や骨髄細胞等で発現され、タイプIレセプターはNF $\kappa$ Bを核内で誘導することが知られている。また、IL-1RにIL-1 $\alpha$ やIL-1 $\beta$ と同程度の親和力で結合するが、生物活性を有さないIL-1レセプターアンタゴニスト（以下「IL-1ra」という）があり、IL-1のIL-1Rへの結合を競合的に阻害することも知られている。

#### 【0004】

IL-18は、インターフェロン $\gamma$ （以下「IFN- $\gamma$ 」という）の生成を促進し、ナチュラルキラー細胞の活性を高め、IL-12と共働してT細胞からIFN- $\gamma$ の生成を誘導し、Th1（IL-2産生性ヘルパーT細胞）応答における重要な役割を果たすことや、機能が似ているIL-12とは構造的に異なり、IL-1とは類似の構造を有することが知られている。また、IL-18は、IL-1 $\beta$ の場合と同様に、その成熟化のためにIL-1 $\beta$ 変換酵素（ICE）/カスパーゼ1による分割を必要とする不活性先駆体として産生され、またIL-1R-関連キナーゼ（IRAK）及びNF- $\kappa$ Bを活性化することも知られている。

## 【0005】

また、これまでに I L - 1 R と相同性を示す分子が複数同定されており、現在これら I L - 1 R ファミリーを介するシグナル伝達経路が盛んに研究されている。M y D 8 8 は、I L - 1 R 相同領域と D e a t h ドメインからなる細胞質内タンパク質であり、I L - 1 刺激後の I L - 1 R コンプレックスへ I R A K を取込んで、N F -  $\kappa$  B を活性化するアダプター分子として機能することも知られている。また、M y D 8 8 遺伝子は、当初、I L - 6 による刺激分化により、骨髓白血球細胞 M 1 をマクロファージへ速やかに誘導する骨髓細胞分化初期応答遺伝子として分離されたことも知られている。

## 【0006】

また、グラム陰性細菌表層のペプチドグリカンを取り囲んで存在する外膜の重要構成成分であるリポ多糖からなる菌体内毒素はエンドトキシンと呼ばれ、リポ多糖はリピド A と呼ばれる脂質とこれに共有結合した各種の糖から構成されることが知られている。そして、このエンドトキシンは、主として発熱、白血球や血小板の減少、骨髓出血壊死、血糖低下、I F N 誘発、B リンパ球（骨髓由来免疫応答細胞）の活性化等の生物活性を有することも知られている。

## 【0007】

他方、胚性幹細胞（以下「E S 細胞」という）を用いたトランスジェニックマウスと、人工的にゲノム上の特定遺伝子を相同組換えにより変化させる遺伝子ターゲットングとを用いたノックアウトマウスを用いると、特定の遺伝子の機能を個体レベルで解析しうることが知られている。そして、一般に、遺伝子欠損マウスはノックアウトマウスと呼ばれているが、M y D 8 8 ノックアウトマウスは知られていない上に、M y D 8 8 ノックアウトマウスが細菌細胞壁成分に対して不応答性であることも知られていなかった。

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、被検物質のエンドトキシン活性や、I L - 1 活性や、I L - 1 8 活性を評価することができる M y D 8 8 ノックアウトマウス等の M y D 8 8 遺伝子機能が欠損した非ヒト動物や、細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノ

ックアウトマウスを提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、プラスミドベクターを用いてES細胞で相位的組換えによってMyD88遺伝子領域のC末端部分をコードした2つのエキソン領域をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またC末端側にHSV-tk遺伝子を導入させて、G418とガンサイクロヴィア(gancyclovir)に対して2重に抵抗力のあるES細胞クローンをスクリーニングし、このES細胞クローンをC57BL/6のマウスの胚盤胞(blastocysts)の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくるMyD88遺伝子機能が欠損したMyD88ノックアウトマウスが、生まれてから20週間は明らかに異常を示さないトランスジェニックマウスであり、また、かかるMyD88ノックアウトマウスがグラム陰性細菌の細胞壁成分やグラム陽性細菌の細胞壁成分に対して不応答性であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち本発明は、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする細菌細胞壁成分不応答性の非ヒト動物（請求項1）や、細菌細胞壁成分が、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンであることを特徴とする請求項1記載の非ヒト動物（請求項2）や、細菌細胞壁成分が、グラム陽性菌の細胞壁成分であることを特徴とする請求項1記載の非ヒト動物（請求項3）や、グラム陽性菌の細胞壁成分が、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン、リポテイコ酸又は結核菌溶解物であることを特徴とする請求項3記載の非ヒト動物（請求項4）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項4記載の非ヒト動物（請求項5）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項5記載の非ヒト動物（請求項6）に関する。

【0011】

また本発明は、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性を評価することを特徴とする



被検物質の評価方法（請求項 7）や、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 8）や、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 8 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 9）や、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物の野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 1 0）や、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物の野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 1 1）や、骨髓細胞分化初期応答遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と該非ヒト動物の野生型非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質のインターロイキン-1 8 活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 1 2）や、非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 7 ～ 1 2 のいずれか記載の被検物質の評価方法（請求項 1 3）に関する。

## 【0 0 1 2】

さらに本発明は、細菌細胞壁成分に対して不応答性であることを特徴とするノックアウトマウス（請求項 1 4）や、細菌細胞壁成分が、グラム陽性菌の細胞壁成分であることを特徴とする請求項 1 4 記載のノックアウトマウス（請求項 1 5）に関する。

## 【0 0 1 3】

またさらに本発明は、細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノックアウトマウスに被検物質を投与して、該被検物質中の細菌細胞壁成分を検出することを特徴とする細菌細胞壁成分の検出方法（請求項 1 6）や、細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノックアウトマウスと野生型マウスに被検物質を投与して、該被検物質中の細菌細胞壁成分を検出することを特徴とする細菌細胞壁成分の検出方法（請求項 1 7）に関する。

## 【0 0 1 4】

## 【発明の実施の形態】

本発明において、MyD88遺伝子機能の欠損とは、染色体上のMyD88遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現されるMyD88を発現する機能が失われていることをいい、また、MyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物としては、MyD88ノックアウトマウスその他、例えばMyD88遺伝子機能が欠損したラット等の齧歯目動物を例示することができる。これらMyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物としては、メンデルの法則に従い出生してくるものが、MyD88欠損型と同腹の野生型を得ることができ、これらを用いて正確な比較実験をすることができる点で好ましい。かかるMyD88遺伝子機能が欠損した非ヒト動物の作製方法を、MyD88ノックアウトマウスを例にとって以下説明する。

## 【0015】

MyD88遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーからPCRにより得られた遺伝子断片を用いてスクリーニングすることができる。スクリーニングされたMyD88遺伝子は、プラスミドベクター等を用いてサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNAシーケンシングにより特定することができる。次に、標的（ターゲティング）ベクターを、例えばネオマイシン抵抗遺伝子等マーカー遺伝子で置換した後、標的ベクターを線状化してES細胞にトランスフェクションし、例えばG418に抵抗性を示すクローンをスクリーニングし、得られる標的ESクローンをマウスの胚盤胞(blastocysts)中にマイクロインジェクションする。キメラマウスは、雌マウスと交尾させられ、得られるヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るためインタークロスすると、目的とするMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスがメンデルの法則に従い出生してくる。

## 【0016】

得られたMyD88ノックアウトマウスが細菌細胞壁成分に対して不応答性であることは、例えば、グラム陰性菌の細菌細胞壁成分であるLPSをMyD88ノックアウトマウスに静脈注射等により投与し、例えば発熱、ショック、白血球や血小板の減少、骨髓出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球（骨髓由来免疫応答細胞）の活性化等のエンドトキシンの生物活性を測定することや、My

D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージと脾臓 B 細胞に、細菌由来の L P S、又はグラム陽性菌菌体成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の存在下において、例えば T N F 誘発、脾臓 B 細胞増殖応答、脾臓 B 細胞表面での M H C クラス II 抗原の発現を測定することにより確認することができる。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスは、現在までエンドトキシン低応答性として知られている C 3 H / H e J マウスよりもエンドトキシン応答性が低下しており、ショック症状は全く認められず、また、M y D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞は、エンドトキシンに対して不応答性であるばかりでなく、グラム陽性細菌細胞壁成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等に対しても不応答性であって、他方 I L - 4 や I F N -  $\gamma$  に対して応答性であることから、この細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノックアウトマウスは、エンドトキシンやペプチドグリカン、リポテイコ酸等の作用機序の解明やエンドトキシンショックへの対処方法の確立に有用なモデルとすることができる。

## 【 0 0 1 8 】

また、M y D 8 8 ノックアウトマウス、あるいはこの M y D 8 8 ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスを対照として用いることにより、被検物質のエンドトキシン活性を正確に評価することができる。このように、被検物質のエンドトキシン活性を正確に評価することにより、エンドトキシン拮抗物質等のエンドトキシンによるショックや発熱作用を抑制することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

## 【 0 0 1 9 】

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、あるいはこの M y D 8 8 ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは M y D 8 8 ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスに被検物質を投与して、被検物質の I L - 1 活性を評価することができる。評価対照となる I L - 1 活性としては、フィトヘماغグルチニン ( P H A )、コンカナバリン A ( C o n A ) 等のマイトジェンや、低濃度の I L - 2

との共刺激によるT細胞の増殖誘導活性や、単球やマクロファージに作用してTNF、IL-1、IL-6の産生を誘導する活性などを挙げることができる。

#### 【0020】

また、MyD88ノックアウトマウス、あるいはこのMyD88ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスを対照として用いることにより、被検物質のIL-1活性を正確に評価することができ、さらに、病態モデルマウスにおけるIL-1の疾患との関わりを検索することができる。このように、被検物質のIL-1活性を正確に評価したり、病態モデルマウスにおけるIL-1の関与を解析することにより、例えば、IL-1発現過多に起因するリウマチ様関節炎、移植片対宿主病、喘息等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

#### 【0021】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、あるいはこのMyD88ノックアウトマウスと共にその野生型マウス、好ましくはMyD88ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスに被検物質を投与して、被検物質のIL-18活性を評価することができる。評価対照となるIL-18活性としては、IFN- $\gamma$ の生成を促進する活性、NK細胞活性を高める活性、IL-12と共働してT細胞からIFN- $\gamma$ の生成を誘導する活性、及びIRAKやNF- $\kappa$ Bを活性化する作用を挙げることができる。

#### 【0022】

また、MyD88ノックアウトマウス、あるいはこのMyD88ノックアウトマウスと共に野生型マウス、好ましくは同腹の野生型マウスを対照として用いることにより、被検物質のIL-18活性を正確に評価することができる。このように、被検物質のIL-18活性を正確に評価することにより、例えば、IL-18の過剰産生に起因するI型糖尿病や移植片対宿主病等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

#### 【0023】

#### 【実施例】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術

的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1 (MyD88ノックアウトマウスの作製)

MyD88遺伝子を129/SvJマウス遺伝子ライブラリー(Stratagene社製)からスクリーニングし、pBluescriptベクター(Stratagene社製)中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNAシーケンシングにより特定した。標的ベクターは、pMC1-neo(Stratagene社製)からのネオマイシン抵抗遺伝子で、1.0 kb 遺伝子断片を置換することにより構築された。置換された遺伝子断片は、IL-1RAcP(受容体補助タンパク)の細胞質ドメインに似ているドメインをコードする2つのエクソンを含んでいた。ネオマイシン抵抗遺伝子は、1.1 kbの5' 遺伝子断片と5.2 kbの3' 遺伝子断片をフランキング配列として有していた。次いで、HSV-tkカセットを遺伝子断片の3' 端に導入した。線状化された標識ベクターでES細胞E14.1をトランスフェクションし、G418及びガンシクロヴィアで選択した。両者に抵抗性を示す176個のクローンを、PCRによる相同組換えのためにスクリーニングし、図1に示すプローブを用いるサザンブロット分析により33個を確かめた。

#### 【0024】

3個の独立的に同定された標的ESクローンを、C57BL/6マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションした。得られたキメラマウスを、ヘテロ接合体マウスを作製するために、C57BL/6雌マウスと交尾させた。ヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るため、インタークロスされ、これらのインタークロスから予測されたメンデル比(+/+ : +/- : -/- = 52 : 93 : 53)で生まれ、MyD88欠損マウスを作製することができた。本発明のMyD88ノックアウトマウスは健康に育ち、20週の年齢まで異常を示さなかった。突然変異によりMyD88遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、ノーザンブロット分析を行ったところ、MyD88 mRNAはMyD88欠損マウスの肝臓及び脾臓からは検出されなかった。また、胸腺、脾臓及リンパ節中のCD3、B220、CD4及びCD8のフローサイトメトリーで、リンパ球組成は野生型マウスと比較してMyD88ノックアウトマウスにおいても変わっていないかった。

## 【0025】

## 実施例 2 (MyD88 ノックアウトマウスのエンドトキシン不応答性)

本発明の MyD88 ノックアウトマウス 10 匹に、大腸菌 (O55:B5) 由来の LPS を 1 mg 投与し、その生存率によりエンドトキシン不応答性を調べた。対照として同腹の野生型マウス 10 匹を用いた。結果を図 2 に示す。図 2 より、野生型マウスは LPS に応答し、投与後 4 日ですべて死亡したが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスは、LPS 投与後 4 日では死亡するものではなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

## 【0026】

## 実施例 3 (MyD88 ノックアウトマウスの IL-1 仲介機能の欠失)

本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞  $1 \times 10^5$  を、T 細胞増殖についての IL-1 との共刺激物であるフィトヘマグルチニン (PHA)  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、コンカナバリン A (ConA)  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  又は  $2 \text{ ng}/\text{ml}$  の IL-2 のそれぞれと、IL-1 $\beta$  (Genzyme 社)  $100 \text{ U}/\text{ml}$  との混合物と共に 96 ウェルの培養皿で 72 時間培養し、T 細胞を増殖させた。T 細胞の増殖は、細胞内に取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] チミジンの [ $^3\text{H}$ ] 量を測定することにより求めた。その結果、PHA、ConA、IL-2 と IL-1 $\beta$  の共存下で培養したとき、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞は大いに増殖したが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞は細胞増殖の増加がほとんど見られなかった (図 3 参照)。また、胸腺細胞に代えて脾臓 B 細胞を用いても、同じような結果が得られることがわかった。

## 【0027】

また本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞を、ホルボール 12-ミリスチン酸塩 13-酢酸塩パラメトキシアンフェタミン (PMA)  $10 \text{ ng}/\text{ml}$  又は ConA  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  と IL-2 (Genzyme 社)  $20 \text{ ng}/\text{ml}$  との共存下で上記と同じように培養させ、細胞増殖の増加を見たところ、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞と、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞とは、IL-2 と PMA や ConA との反応に関しては増殖において差が見られなかった (図 3 参照)。これらのことから、IL-1 が仲介する T 細胞成長シグ

ナルは、本発明のMyD88ノックアウトマウスの胸腺細胞で損なわれていることがわかる。

## 【0028】

本発明のMyD88ノックアウトマウスの静脈内にIL-1 $\beta$  (Genzyme社) 1  $\mu$ gを注入し、2時間後肝臓と血清を取り出した。総RNAをトリゾール試薬 (GIBCO社)を用いて肝臓から抽出し、このRNA (10  $\mu$ g)を電気泳動にかけ、ナイロン膜に移して血清アミロイドA (SAA-I)、血清アミロイドP (SAP) 及びハプトグロビン (HP) のような急性期蛋白質について、<sup>32</sup>PでラベルされたcDNAを用いたノーザンブロット分析にかけ、mRNA発現のIL-1の誘導増加を同腹子の野生型マウスのものと比較したところ、野生型マウスでは誘導の増加が見られたが、MyD88ノックアウトマウスでは見られなかった。

## 【0029】

またIL-1が、腫瘍壊死因子 (TNF) やIL-6のような急性期蛋白質の産生や炎症性のサイトカインを誘導するため、本発明のMyD88ノックアウトマウスと同腹子の野生型マウスから上記の方法で取り出した血清のTNFやIL-6の濃度が増加するかどうかをELISAによって測定した。その結果、野生型マウスにおいてはIL-1 $\beta$ によってTNFやIL-6の濃度が増加したが、MyD88ノックアウトマウスではTNFやIL-6の濃度がIL-1 $\beta$ によって増加されることはなかった (図4参照)。

以上のことから、本発明のMyD88ノックアウトマウスでは、IL-1を介する主な生物学的機能が厳格に欠失していることがわかる。

## 【0030】

実施例4 (MyD88ノックアウトマウスのIL-18仲介機能の欠失)

IL-18がNK細胞の溶解活性を増強することはよく知られている。本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの脾臓B細胞を、IL-18 (林原生化学研究所株式会社) 20 ng/mlの存在下又は不存在下、<sup>51</sup>Crでラベルされたマウスリンホーマ細胞 (以下「YAC-1」という) 標的細胞といっしょに24時間培養し、4時間後ガンマカウンターを用いて上清中

の遊離した<sup>51</sup>Crを測定した。その結果、インビトロで脾臓B細胞をIL-18の存在下培養したとき、野生型マウスにおけるYAC-1標的細胞に対する溶解活性は劇的に増強したが、MyD88ノックアウトマウスにおいては増強されることはなかった。なお、IL-18に代えてIL-2を用いた場合には、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞においても溶解活性が増強した（図5参照）。

## 【0031】

またインビトロで、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞と同腹子の野生型マウスの脾臓B細胞とを20 ng/mlのIL-18で刺激し、24時間培養し、ELISAによって培養上清におけるIFN- $\gamma$ の産生について測定した。その結果、野生型マウスにおいてはIFN- $\gamma$ の産生が誘発されたが、本発明のMyD88ノックアウトマウスではIFN- $\gamma$ の産生は見られなかった（図5参照）。

## 【0032】

95%以上の純度に精製された本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓T細胞及び同腹子の野生型マウスの脾臓T細胞を、2 ng/mlのIL-12存在下、抗CD3抗体（20  $\mu$ g/ml）（PharMingen社）でコーティングされた培養皿で培養し、4日後細胞を採取し、ハンクス平衡塩溶液で洗浄した。洗浄後の細胞（ $2 \times 10^5$ ）は、抗CD3抗体（20  $\mu$ g/ml）でコーティングされた96ウェルの培養皿で、20 ng/mlのIL-18又は2 ng/mlのIL-12で、24時間再び刺激され培養された。その培養上清でのIFN- $\gamma$ の濃度はELISAによって測定し比較された。その結果、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓T細胞は、IL-18に応答したIFN- $\gamma$ の産生を高めることができないことがわかった（図6参照）。

## 【0033】

本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの腹膜内に、熱で殺されたプロピオン酸菌アクネ（*P. acnes*）500  $\mu$ gを注入し、7日後脾臓からT細胞を精製した後、20 ng/mlのIL-18の存在下又は不存在下、抗CD3抗体（20  $\mu$ g/ml）でコーティングされた96ウェルの



培養皿で24時間培養し刺激し、その培養上清におけるIFN- $\gamma$ の濃度をELISAによって測定した。また本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの静脈内に、カルメット-ゲラン菌(BCG)(共和化学)2mgを注入し、14日後脾臓からT細胞を精製した後、上記のように24時間培養し刺激し、IFN- $\gamma$ の濃度を測定した。その結果、どちらの場合も、野生型マウスにおいてはIL-18に応答して高レベルのIFN- $\gamma$ が産生されたが、本発明のMyD88ノックアウトマウスではIL-18の存在下でIFN- $\gamma$ の産生を高めることはできなかった(図6参照)。

## 【0034】

以上のことから、本発明のMyD88ノックアウトマウスは、IL-18欠損マウスと同様に、インビボでのTh1細胞への発展に欠陥があり、IL-18を介する主な生物学的活性は完全に欠失していることがわかる。

## 【0035】

次に、ドミナントネガティブ(dominant negative)MyD88の突然変異が、IL-18誘導NF- $\kappa$ B活性化も阻害するかどうか検討した。COS-7細胞は、NF- $\kappa$ B依存ルシフェラーゼレポーター(luciferase reporter)遺伝子と共にMyD88(アミノ酸152から296)発現ベクターで過渡的にトランスフェクションされ、IL-18処理後のルシフェラーゼ活性が測定された。MyD88のコイクスプレッションはIL-18誘導活性をほぼ完全に阻害した(図7参照)。

## 【0036】

またIL-18は、AP-1依存遺伝情報を活性化することから、MyD88(アミノ酸152から296)がIL-18誘導AP-1活性化のドミナントネガティブ突然変異としても働くかどうか試験した。IL-18での刺激はAP-1活性を約3~4倍増加し、この活性化はMyD88(アミノ酸152から296)のコイクスプレッションで阻害された(図7参照)。これらの結果は、MyD88がNF- $\kappa$ BとAP-1のIL-18誘導活性化に関与していることを示している。

## 【0037】

次に、NF- $\kappa$ B の IL-18 誘導活性化が MyD88 欠損細胞で見られるかどうかを検討した。IL-12 及び抗 CD3 抗体の存在下で 4 日間培養された脾臓 T 細胞を 3 時間飢餓状態にした後 IL-18 で刺激した。刺激された細胞から抽出された核が、NF- $\kappa$ B 接合部を含む特定のプローブを用いたゲルモビリティシフト (mobility shift) で分析された。IL-18 誘導 NF- $\kappa$ B DNA 接着活性は、野生型細胞からの核抽出物中では検出されたが、MyD88 欠損細胞からは検出されなかった。他方、野生型あるいは MyD88 欠損胸腺細胞を TNF $\alpha$  で処理すると、ほとんど同レベルの NF- $\kappa$ B DNA 接着活性を生じ、MyD88 欠損細胞中の欠損 IL-18 誘導 NF- $\kappa$ B 活性は、NF- $\kappa$ B の異常機能あるいは調節低下によるものではないことを示した。

## 【0038】

NF- $\kappa$ B の活性化の誘導に加えて、IL-1 は C-Jun N 末端キナーゼ (JNK) を活性化することが知られている。IL-18 が JNK の活性化を誘導するかどうか試験するため、代替として GST-c-Jun-融合蛋白を使ってインビトロ キナーゼ分析を行った。IL-18 を使った処理は、野生型マウスの Th1-発達細胞中の JNK の活性化を誘導したが、IL-18 誘導 JNK 活性化は MyD88 欠損細胞では見られなかった。反対に JNK の通常の活性が TNF- $\alpha$  で処理した MyD88 欠損細胞で見られた。IL-18 誘導による NF- $\kappa$ B 及び JNK の活性は、MyD88 欠損マウス中では欠失している。これらの結果は、MyD88 が NF- $\kappa$ B 及び JNK の IL-18 誘導活性化に必須であることを示している。

## 【0039】

実施例 5 (MyD88 ノックアウトマウスのマクロファージと脾臓 B 細胞の細菌細胞壁成分不応答性)

## 5-1 (TLR4 欠損マウスの作製)

最近、C3H/HeJ マウスが Toll 様受容体 (TLR) 4 遺伝子のミスセンス点突然変異により LPS に対して低応答性であることが報告され (Science 282, 2085-8, 1998、J. Exp. Med. 189, 615-625, 1999、J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999)、また本発明者らによって、TLR4 欠損マウスのマクロファ-

ジと脾臓B細胞がLPSに低応答性であり、TLR4遺伝子がLPSシグナル伝達に不可欠であることが判明した (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999)。そこで、TLR4欠損マウスとMyD88欠損マウスとのマクロファージと脾臓B細胞の細菌細胞壁成分に対する応答性を比較するために、TLR4欠損マウス (129/OlaXC57BL/6から交配したF<sub>2</sub>) を文献記載 (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999) のようにジーンターゲット法により作製した。また、以下の実施例には、年齢が一致する野生型マウス、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスを使用した。

#### 【0040】

##### 5-2 (細菌細胞壁成分の調製)

フェノール抽出し、ゲル濾過法によって精製されたエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) 血清型O55:B5 (シグマ社製)、クレブシェラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) (シグマ社製)、シュードモナス・アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 血清型10 (シグマ社製)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) (シグマ社製)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) (シグマ社製)、フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 血清型1A (シグマ社製)、ビブリオ・コレレエ (*Vibrio cholerae*) 血清型イナバ569B (シグマ社製) 等のLPSを購入した。フェノールクロロフォルム石油エーテル抽出法により調製されたサルモネラ・ミネソタ (*Salmonella minnesota*) Re-595のLPSは購入した (シグマ社製)。また、文献 (FEBS Lett. 332, 197-201, 1994) 記載の方法で、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) 381のLPS及びリピドAを調製した。結核菌の全細胞溶解物は、デュボス培地 (ディフコ社製) で結核菌アオヤマB株 (N1HJ1635) を1ヶ月間培養した後、細胞を回収してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で再懸濁し、細胞を超音波処理して調製した。

#### 【0041】

##### 5-3 (腹膜マクロファージの調製)

上記作製した野生型マウス、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスのそれぞれの腹腔内に4%のチオグリコール酸塩を2mlずつ注入し、3日後に腹

膜腔から腹膜滲出細胞を単離し、氷温のハンクス緩衝液 (Hank's buffered salt solution: HBSS) で洗浄することによって腹膜細胞を得た。この細胞を RPMI 1640 培地に浮遊させ、プラスチックシャーレに分注し、37℃で2時間培養し、その後、ハンクス緩衝液で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

## 【0042】

5-4 (サルモネラ・ミネソタ Re-595 の LPS に対する不応答性)

上記野生型マウス、TLR4 欠損マウス、MyD88 欠損マウス等のそれぞれの腹膜マクロファージの LPS に対する応答性をサルモネラ・ミネソタ Re-595 の LPS を用いて調べた。それぞれのマウスの腹膜マクロファージを、種々の濃度 (0, 0.01, 0.1, 1, 10 又は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の LPS の存在下で24時間培養して刺激し、LPS 応答性のマクロファージから放出される腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の濃度を ELISA により測定した (図8A参照)。この結果から、野生型マウスのマクロファージでの TNF- $\alpha$  の産生は、LPS の投与量に応じて増加するのに対して、TLR4 欠損マウスや MyD88 欠損マウスでは、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の LPS 刺激においても TNF- $\alpha$  を産生せず、これらが LPS 不応答性であることがわかった。

## 【0043】

また、サルモネラ・ミネソタ Re-595 の LPS に対する脾臓B細胞の応答性についても調べてみた。野生型マウス、TLR4 欠損マウス、MyD88 欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を単離し、96ウェルの培養皿内で培養し、種々の濃度 (0, 0.01, 0.1, 1, 10 又は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の LPS で脾臓B細胞を刺激した。培養から40時間後に 1  $\mu\text{Ci}$  の [ $^3\text{H}$ ]ーチミジン (デュポン社製) を添加して更に8時間培養し、[ $^3\text{H}$ ] の摂取量を  $\beta$ シンチレーションカウンター (パカード社製) で測定した (図8B参照)。この結果から、LPS の刺激により野生型マウスの脾臓B細胞では、LPS の投与量に依存して細胞増殖反応を促進したが、TLR4 欠損マウス又は MyD88 欠損マウスのどちらの脾臓B細胞においても、LPS による細胞増殖反応は見られなかった。

## 【0044】

また、フローサイトメトリーにより、Re-595のLPSに対する応答における脾臓B細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII(I-A分子)の発現について調べてみた。野生型マウス、MyD88欠損マウス及びTLR4欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞( $1 \times 10^6$ )を種々の濃度(0, 0.01, 0.1, 1, 10又は $100 \mu\text{g/ml}$ )のLPS共存下に48時間培養した。培養後細胞を採取して、フィコエリトリン(phycoerythrin: PE; ファーミンジェン社製)で標識した抗B220抗体、又はビオチン化抗マウスI-A<sup>b</sup>抗体(ファーミンジェン社製)に、フルオレセインイソシアネート(FITC; ファーミンジェン社製)で標識したストレプトアビジンを結合させたFITC標識化抗体により、それらの細胞表面におけるI-A分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエストのソフトウェア(ベクトンディッキンソン社製)により蛍光活性化セルソーターキャリバー(FACS Calibur)で分析した。この結果から、Re-595のLPSは、野生型の脾臓B細胞表面でのI-A分子の発現を増大しているのに対し、TLR4欠損マウスやMyD88欠損マウスの脾臓B細胞では、高濃度のLPS( $100 \mu\text{g/ml}$ )で刺激しても、I-A分子の発現は増大しなかった(図8C参照)。以上のことから、TLR4欠損マウスとMyD88欠損マウスは共にサルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対して不応答であることがわかる。

## 【0045】

5-5(IL-4とIFN- $\gamma$ に対するTLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの応答性)

TLR4欠損及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞が全ての刺激物に対して不応答性であるかどうかを調べるため、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞の他の刺激物に対する応答性を検討したところ、以下に示すように応答性は損なわれておらず、これらのマウスはLPSに対する応答性が特異的に欠損していることがわかった。

## 【0046】

野生型マウス、MyD88欠損マウス、及びTLR4欠損マウスのそれぞれの

脾臓B細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を単離し、IL-4 (Genzyme社製) 及び抗IgM抗体の共存下又は抗CD40抗体の存在下において40時間培養し、 $[^3\text{H}]$ -チミジン (デュポント社製) を添加して更に8時間培養し、 $[^3\text{H}]$  の取込み量を $\beta$ シンチレーションカウンターで測定した (図9A参照)。この結果から、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞は、IL-4 及び抗IgM抗体の混合物、又は抗CD40抗体に対する応答において、野生型マウスの脾臓B細胞と同じ挙動を示した。

## 【0047】

次に、野生型マウス、MyD88欠損マウス、及びTLR4欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を、 $100\text{U}/\text{ml}$  のIL-4の存在下又は非存在下において48時間培養しそれらの細胞を刺激した。その後、PE標識抗B220抗体又はFITC標識抗マウスI-A<sup>b</sup>抗体により、脾臓B細胞表面のI-A分子と結合させて細胞を染色し、セルクエスト・ソフトウェアを用いて蛍光活性化セルソーターキャリバーで細胞増殖を測定した (図9B参照)。その結果、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞は、IL-4に対する応答においても、野生型マウスの脾臓B細胞と同じ挙動を示した。

## 【0048】

野生型マウス、MyD88欠損マウス又はTLR4欠損マウスのそれぞれの腹腔内に、 $5000\text{U}$  のIFN- $\gamma$  (Genzyme社製) 又はPBSを投与し、投与から3日後に腹膜マクロファージを採取し、FITC標識抗マウスI-A<sup>b</sup>抗体でマクロファージの膜面に存在するI-A分子と結合させて細胞を染色し、セルクエストのソフトウェアにより蛍光活性化セルソーターキャリバーで分析した (図9C参照)。この結果から、野生型マウス、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスにおいて、腹膜マクロファージでのI-A分子の発現、すなわちIFN- $\gamma$  が誘発する細胞増殖の阻害も同程度であった。

## 【0049】

## 5-6 (貧食作用分析)

野生型マウス、MyD88欠損マウス及びTLR4欠損マウスのマクロファージに0.025%の蛍光ラテックスビーズ ( $0.75\mu\text{m}$ ) (ポリサイエンス社

製)を加え、37℃で2時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養した。その後、貧食されなかったビーズを取り除くため、この培養物をPBSで3回勢いよく洗浄し、20分間、2.5%のホルムアルデヒドを含むPBSでインキュベートし、培養物をホルムアルデヒドで固定した。これらの固定細胞を、Axiophoto顕微鏡(Carl Zeiss社製)で視覚化したところ、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの腹膜マクロファージは共に、ラテックス粒子を貧食していることがわかった。したがって、これらの他の刺激によるTLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスのマクロファージの貧食能は損なわれていないことがわかった。

#### 【0050】

5-7 (ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答性)

ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSは、LPS低応答性であるC3H/HeJマウスの細胞の活性化能において、ある程度の反応を示すことから(J. Immunol. 158, 4430-6, 1997)、それぞれのマウスのポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。野生型マウスのマクロファージでは、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSの投与量に依存してTNF-αを誘発していたが、TLR4欠損マウスのマクロファージでは、C3H/HeJマウスのマクロファージと同様に低応答性であり、野生型マウスのマクロファージの3分の1程度のTNF-α産生能を示したに過ぎなかった。これに対し、MyD88欠損マウスのマクロファージでは、高濃度のLPSで刺激しても、検出しうる程のTNF-αを産生しなかった(図10A参照)。

#### 【0051】

また、ポルフィロモナス・ジンジバリス381のLPSに対して、TLR4欠損マウスの脾臓B細胞は低レベルの増殖応答を示し、脾臓B細胞のI-A分子の発現を増大させていたが、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞は増殖応答を示さず、I-A分子の発現も確認できなかった(図10B、C参照)。また、ポルフィロモナス・ジンジバリス381のリピドAにおいても同様の結果が得られた。これらのことから、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答にお

いて、TLR4 欠損マウスは低応答性であり、MyD88 欠損マウスは不応答性であることがわかった。また、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSにより誘発されるシグナル伝達に対し、MyD88は必須であるが、TLR4は部分的に寄与していることがわかった。

## 【0052】

5-8 (大腸菌O55:B5のLPSに対する応答性)

大腸菌(O55:B5)のLPSに対する応答性についても、前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。TLR4 欠損マウス及びMyD88 欠損マウスの腹膜マクロファージでは、野生型マウスのマクロファージと比較して、大腸菌(O55:B5)のLPSに対する応答性を損なっていた(図11A)。しかし、高濃度のLPSで刺激した場合、TLR4 欠損マウスのマクロファージは少量のTNF- $\alpha$ を産生したが、それに対してMyD88 欠損マウスのマクロファージは、高濃度のLPS刺激においてもTNF- $\alpha$ を産生しなかった。

## 【0053】

また、これらマウスの脾臓B細胞における増殖応答についても同様な傾向が見受けられた(図11B参照)。さらに、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるLPSで刺激したTLR4 欠損マウスの脾臓B細胞は、野生型マウスの脾臓B細胞と同程度のI-A分子の発現を示したが、MyD88 欠損マウスの脾臓B細胞は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSでの刺激に対してもI-A分子の発現を示さなかった(図11C参照)。以上の結果から、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPS刺激の場合と同様に、TLR4 欠損マウスは大腸菌(O55:B5)のLPSに対して低応答性であるが、MyD88 欠損マウスは不応答性であることがわかった。

## 【0054】

実施例10 (ペプチドグリカンに対する応答性)

グラム陽性菌の主要な細胞壁成分であるペプチドグリカン(PGN)がマクロファージを活性化することが報告されている(J. Immunol. 155, 2620-30, 1995、Infect. Immun. 62, 2715-21, 1994)。そこで、スタフィロコッカス・アウレウスのPGN(Fluka社製)に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-



595の場合と同様に調べた。PGNで刺激した場合、TLR4欠損マウスの腹膜マクロファージは、投与量に依存して野生型マウスのマクロファージとほぼ同程度のTNF- $\alpha$ を産生したが、MyD88欠損マウスのマクロファージは、高濃度のPGN刺激に対してもTNF- $\alpha$ を産生しなかった（図12A参照）。

## 【0055】

スタフィロコッカス・アウレウスのPGNで刺激した場合、野生型マウスの脾臓B細胞は細胞増殖応答を示し、MyD88欠損マウスにおいては野生型マウスと比べて細胞増殖応答が大きく損なわれていたが、その程度がTLR4欠損マウスの場合は小さかった（図12B参照）。また、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を超える濃度のPGNで刺激した場合、野生型マウスもTLR4欠損マウスもI-A分子発現の増大が観察されたが、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞では、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のPGN刺激の場合でもI-A分子の発現の増大は見られなかった（図12C参照）。これらのことより、TLR4欠損マウスは、黄色ブドウ球菌のPGNに対して野生型マウスとほぼ同様の応答を示すが、MyD88欠損マウスは不応答性であることがわかった。

## 【0056】

5-10（リポテイコ酸に対する応答性）

リポテイコ酸（LTA）は、グラム陽性菌の細胞壁成分であって、単球とマクロファージの活性化を誘導する（Infect. Immun. 62, 2715-21, 1994）ことから、ストレプトコッカス・ニューモニアのLTAに対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。野生型マウスの腹膜マクロファージは、LTAの投与量に応じてTNF- $\alpha$ の産生を増大していた。これに対して、MyD88欠損マウスのマクロファージでは、高濃度のLTA刺激に対してもTNF- $\alpha$ を産生しなかった。また、TLR4欠損マウスも野生型マウスと比較するとTNF- $\alpha$ の産生が損なわれていたが、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のLTA刺激ではTNF- $\alpha$ を誘発していた（図13A参照）。

## 【0057】

次に、ストレプトコッカス・ニューモニアのLTA刺激に対するこれらマウス脾臓B細胞の細胞増殖反応とI-A分子の発現の増大を分析した（図13B参照）

）。この結果から、野生型マウスの脾臓B細胞は、LTAの投与量に応じてLTAに対する応答を増大させるのに対し、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞は、LTAに対する増殖反応を非常に損なっていた。TLR4欠損マウスの脾臓B細胞においても増殖反応は損なわれていたが、高濃度のLTAで刺激した場合には増殖応答性を示した。また、野生型マウス及びTLR4欠損マウスの脾臓B細胞では細胞表面においてI-A分子の発現が増大するのに対し、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞では増大がみられなかった（図13C参照）。これらのことから、MyD88欠損マウスはストレプトコッカス・ニューモニアのLTA刺激に対して不応答性であることがわかる。

## 【0058】

## 5-11（結核菌全細胞溶解物に対する応答性）

結核菌細胞壁成分、特にリポアラビノマンナンは、骨髄性細胞の活性化を誘導することで知られていることから（J. Immunol. 149, 541-7, 1992、J. Clin. Invest. 91, 2076-83, 1993）、結核菌全細胞溶解物に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。野生型マウスのマクロファージは、全細胞溶解物の投与量に依存してTNF- $\alpha$ を産生していた。また、TLR4欠損マウスのマクロファージも、野生型マウスのものと比較するとわずかながらTNF- $\alpha$ を産生していた。しかし、MyD88欠損マウスのマクロファージは、高濃度の全細胞溶解物に対してもTNF- $\alpha$ を産生しなかった（図14A参照）。

## 【0059】

次に、結核菌全細胞溶解物による刺激に対するこれらマウスの応答性について調べた。野生型マウスの脾臓B細胞は、全細胞溶解物の投与量に依存して増大する細胞増殖応答と細胞表面でのI-A分子の発現を示し、TLR4欠損マウスの脾臓B細胞でもまた、野生型マウスのものより低いものの細胞増殖応答とI-A分子の発現を示した。これに対して、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞では、増殖反応とI-A分子の発現の増大が大きく損なわれており、全細胞溶解物に対して不応答性であることがわかった（図14B、C参照）。

## 【0060】

## 5-12 (他の菌体細胞壁成分に対する応答性)

野生型マウス、TLR4 欠損マウス及びMyD88 欠損マウスの応答性について、他の菌体細胞壁成分 [クレブシエラ・ニューモニエ、シュードモナス・アウリギノサ10、サルモネラ・チフィムリウム、フレクスナー赤痢菌、ビブリオ・コレラ等のLPS、及び大日本製薬株式会社のカワタシゲオ氏から提供されたスタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) のPGN] に対する応答性についても上記と同様に調べた。結果を表1に示す。この表1から、全ての菌体の成分において、MyD88 欠損マウスが不応答性であることがわかった。

【0061】

【表1】

Test specimen LPS	The responsiveness of mice*		
	wild type	TLR4-/-	MyD88-/-
<i>Escherichia coli</i> O55:B5	++	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	-	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	++	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+	-
<i>Salmonella minnesota</i> Re595	++	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	++	+	-
<i>Shigella flexneri</i>	++	+	-
<i>Vibrio cholerae</i>	++	+	-
PGN			
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	+	-
LTA			
<i>Streptococcus faecalis</i>	++	+	-
Mycobacterial whole cell lysates			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	++	+	-

【0062】

またLPSは、TLR4を独自のシグナル受容体として利用し、不応答性を示

すもの（サルモネラ・ミネソタ Re 595 やクレブシェラ・ニューモニエ等の LPS）や、TLR4 欠損マウスに対して低い応答性を示すもの（ポルフィロモナス・ジンジバリス、エシェリキア・コリ O55:B5、シュードモナス・アウリギノサ、フレクスナー赤痢菌、サルモネラ・チフィムリウム、ビブリオ・コレラ等の LPS）の 2 つの型に分類できることがわかった。後者の LPS に対して MyD88 欠損マウスは応答性を示さないことから、これらの LPS の認識とシグナル伝達は、TLR4 と他の TLR との両方により、及び／又は MyD88 をアダプター分子として使用する TLR 関連受容体により介されるものと考えられる。

#### 【0063】

##### 【発明の効果】

本発明の MyD88 ノックアウトマウスは、細菌細胞壁成分に対して不応答性であり、また IL-1 と IL-18 を介する生物学的機能を欠失していることから、本発明の MyD88 ノックアウトマウスを用いることによって、被検物質のエンドトキシン活性、IL-1 活性、IL-18 活性を評価することが可能となり、ひいては、これらエンドトキシン等の細菌細胞壁成分、IL-1、IL-18 又はこれらのレセプターの過剰な産生等に起因する疾病に対する薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明の MyD88 ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

##### 【図 2】

本発明の MyD88 ノックアウトマウスと野生型マウスに大腸菌由来の LPS を投与した場合の生存率を示す図である。

##### 【図 3】

本発明の MyD88 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける IL-1 を介しての T 細胞増殖の結果を示す図である。

##### 【図 4】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-1誘導による血中のTNFとIL-6のレベル結果を示す図である。

【図5】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-18を介してのNK細胞の活性化の結果を示す図である。

【図6】

本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-12とIL-18の刺激によるIFN- $\gamma$ の産生の結果を示す図である。

【図7】

ドミナントネガティブMyD88の突然変異が、IL-18誘導NF- $\kappa$ B活性及びAP-1活性に関与していることを示す図である。

【図8】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞のサルモネラ・ミネソタRe-595に対する応答性の結果を示す図である。

【図9】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞のIL-4やインターフェロン- $\gamma$ に対する応答性の結果を示す図である。

【図10】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞のポルフィロモナス・ジンジバリスに対する応答性の結果を示す図である。

【図11】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞のエシェリキア・コリO55:B5に対する応答性の結果を示す図である。

【図12】

本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウト

トマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞のペプチドグリカンに対する応答性の結果を示す図である。

【図 1 3】

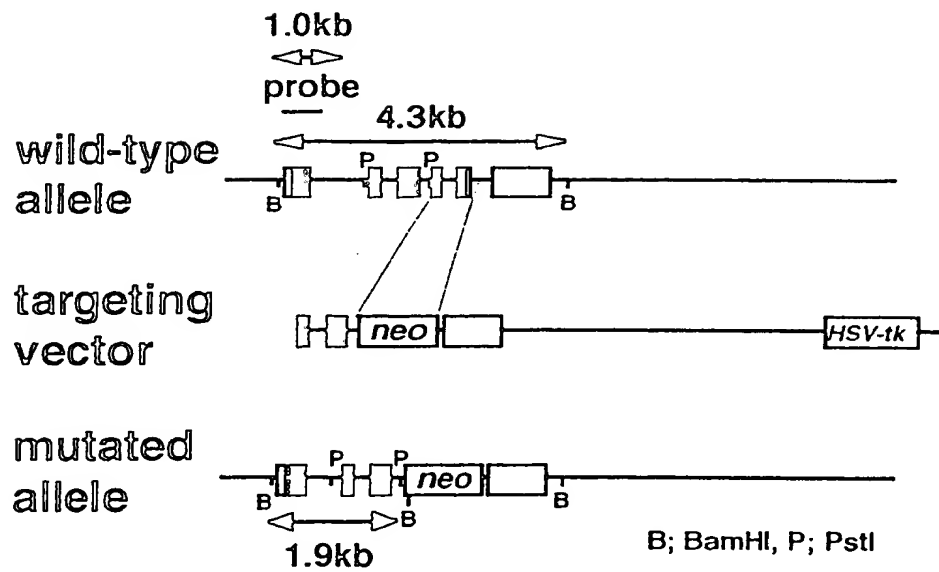
本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞のリポテイコ酸に対する応答性の結果を示す図である。

【図 1 4】

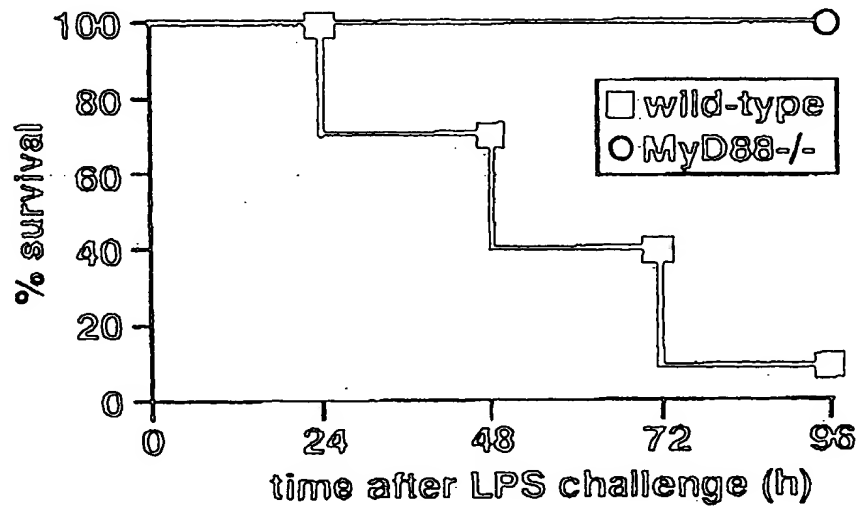
本発明のMyD88ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞の結核菌全細胞溶解物に対する応答性の結果を示す図である。

【書類名】 図面

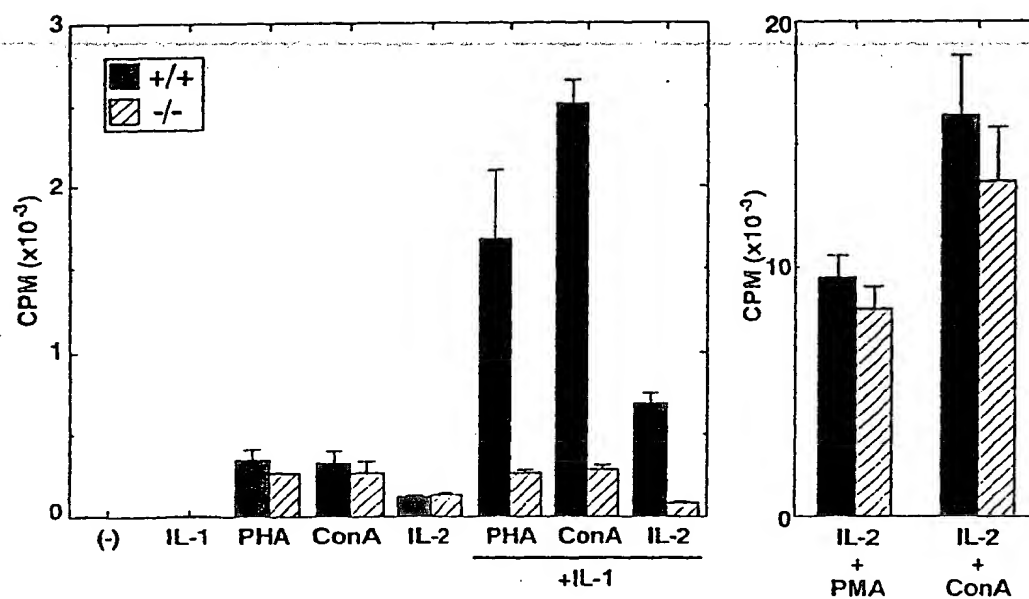
【図 1】



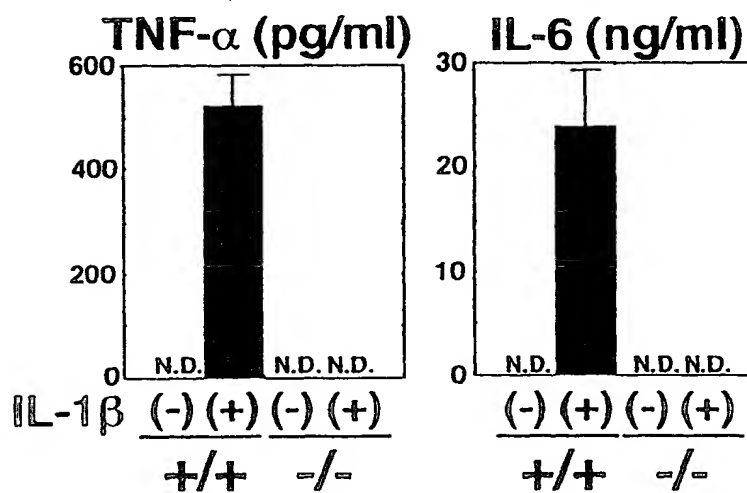
【図 2】



【図 3】

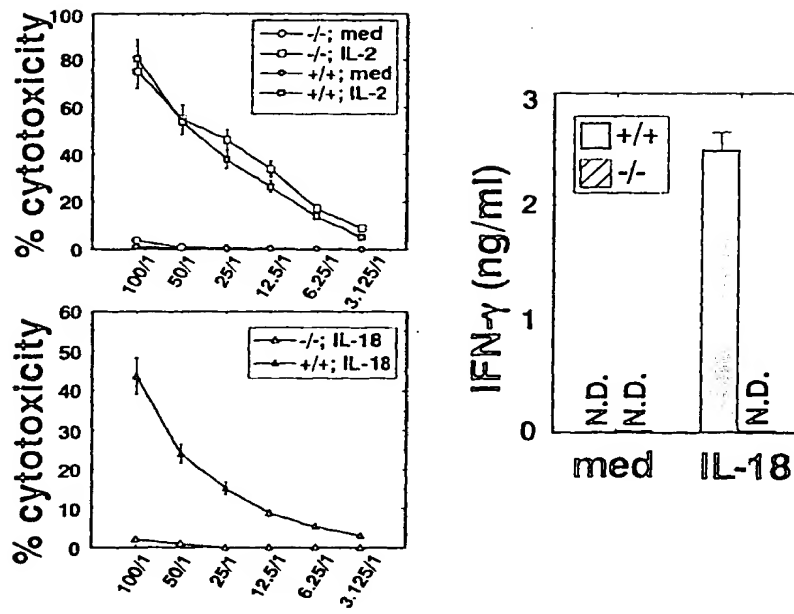


【図 4】

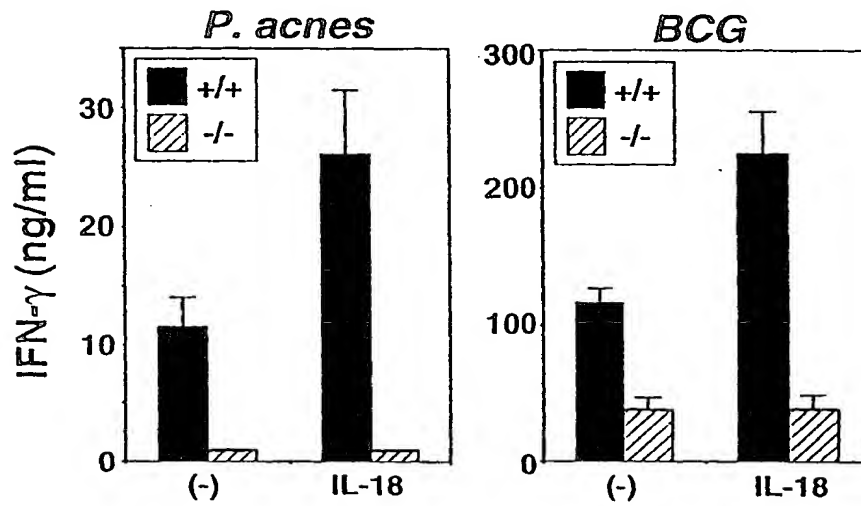
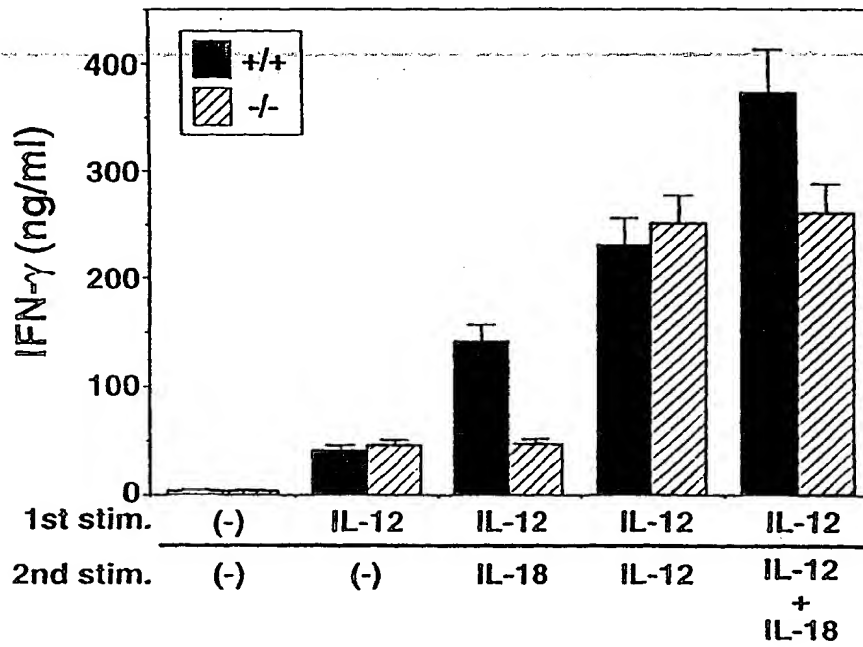




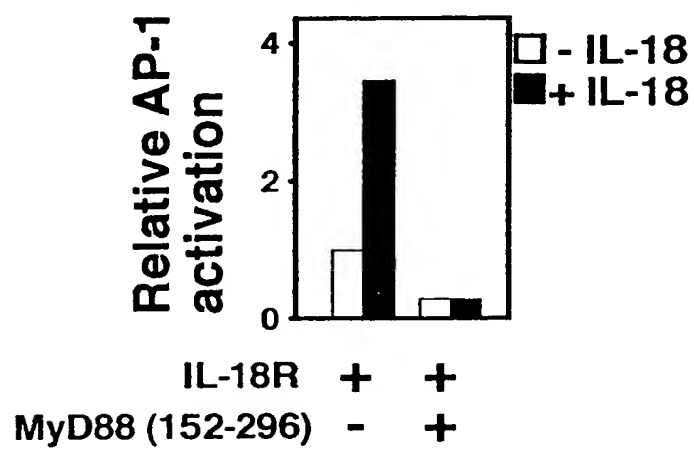
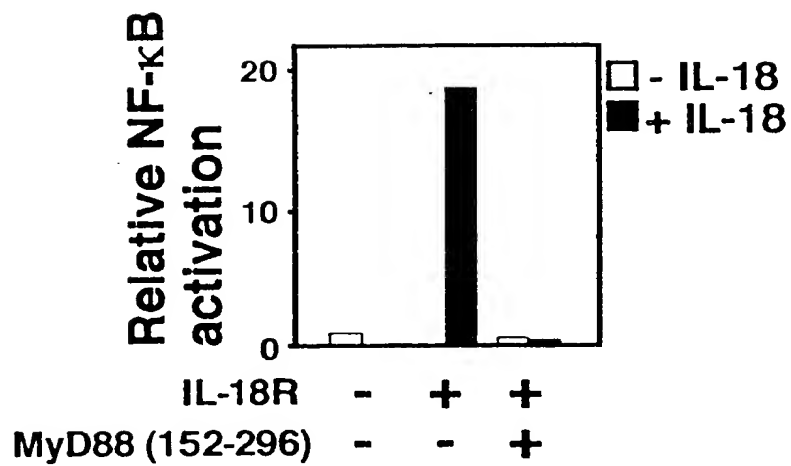
【図 5】



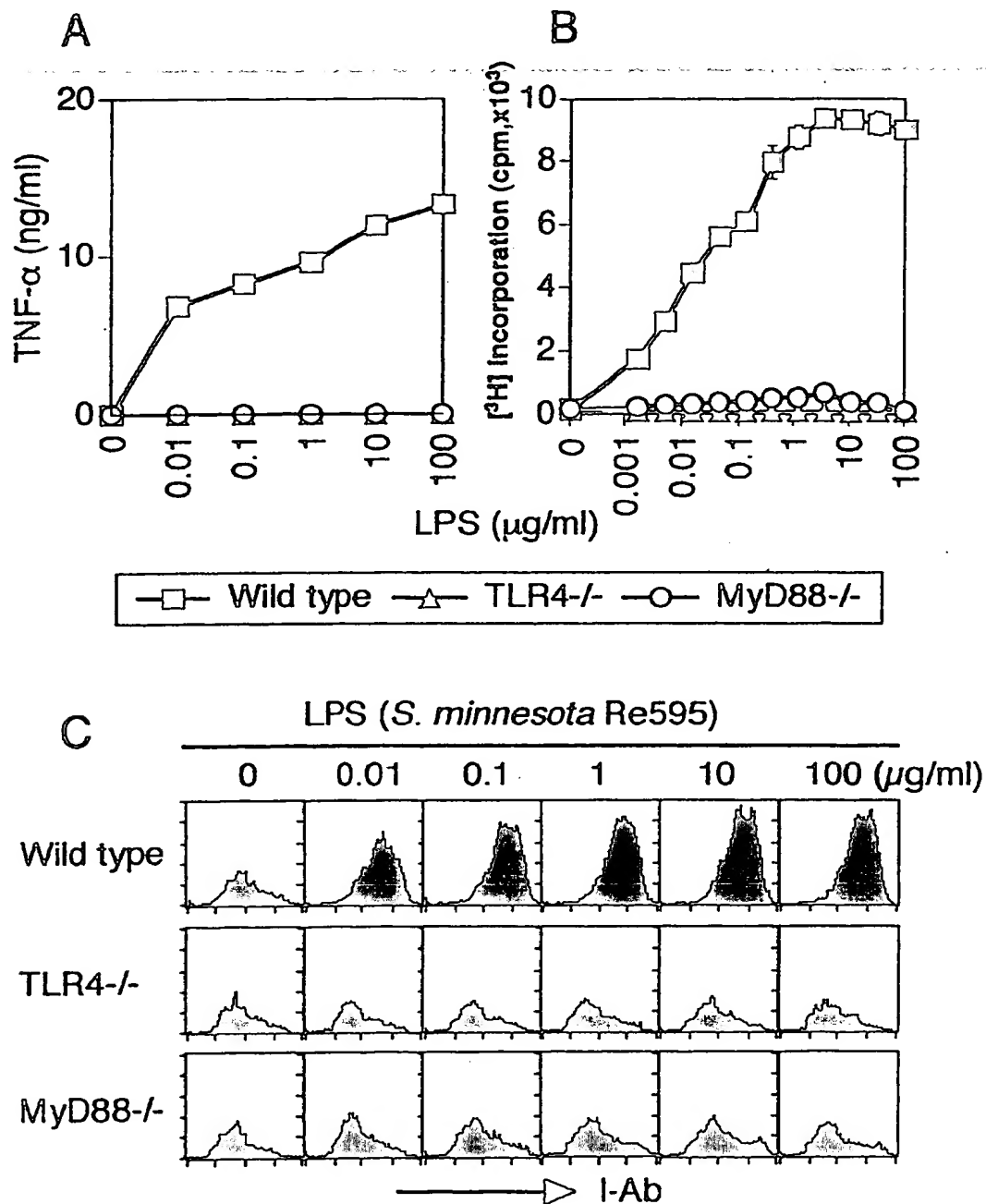
【図 6】



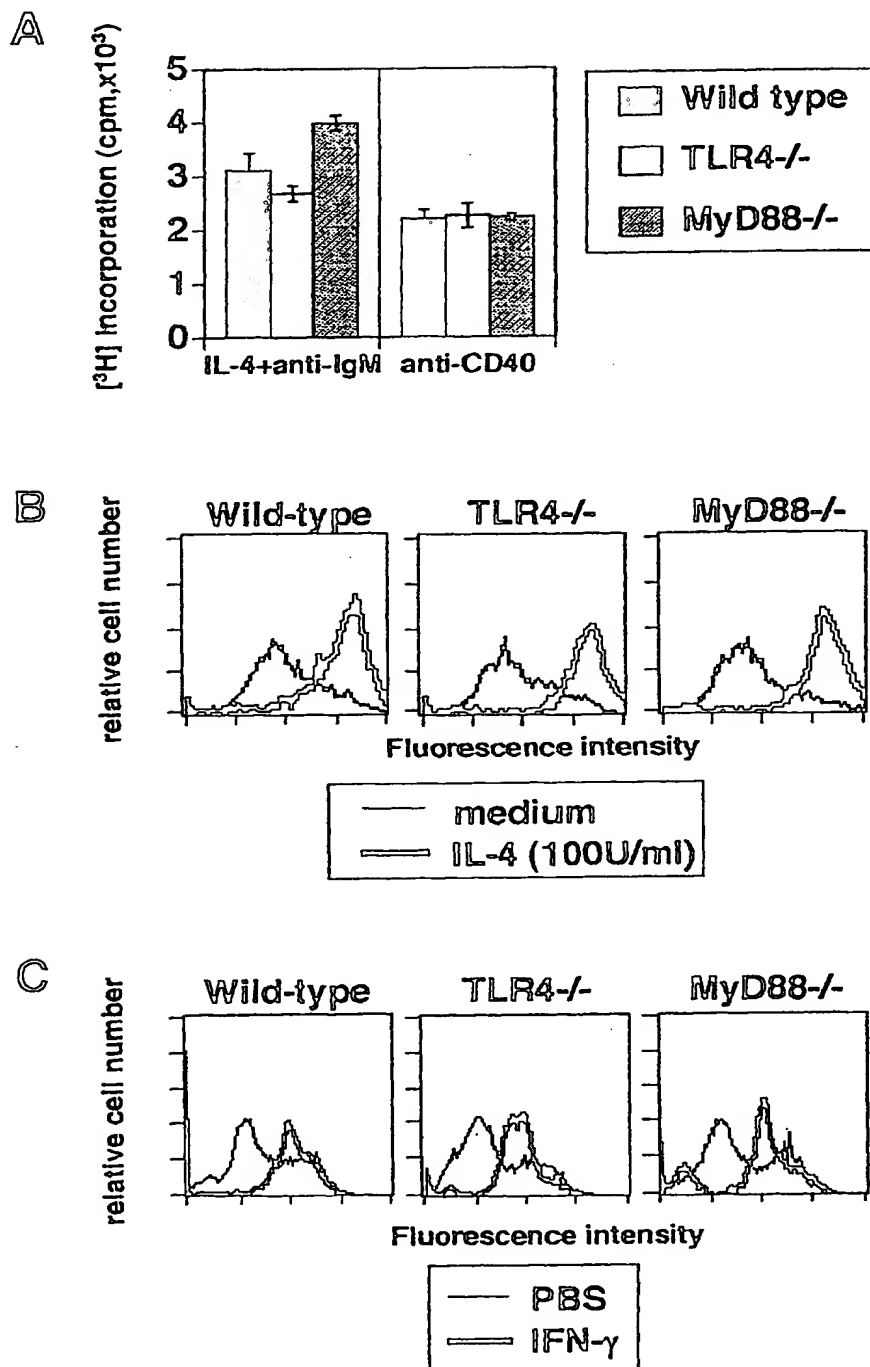
【図 7】



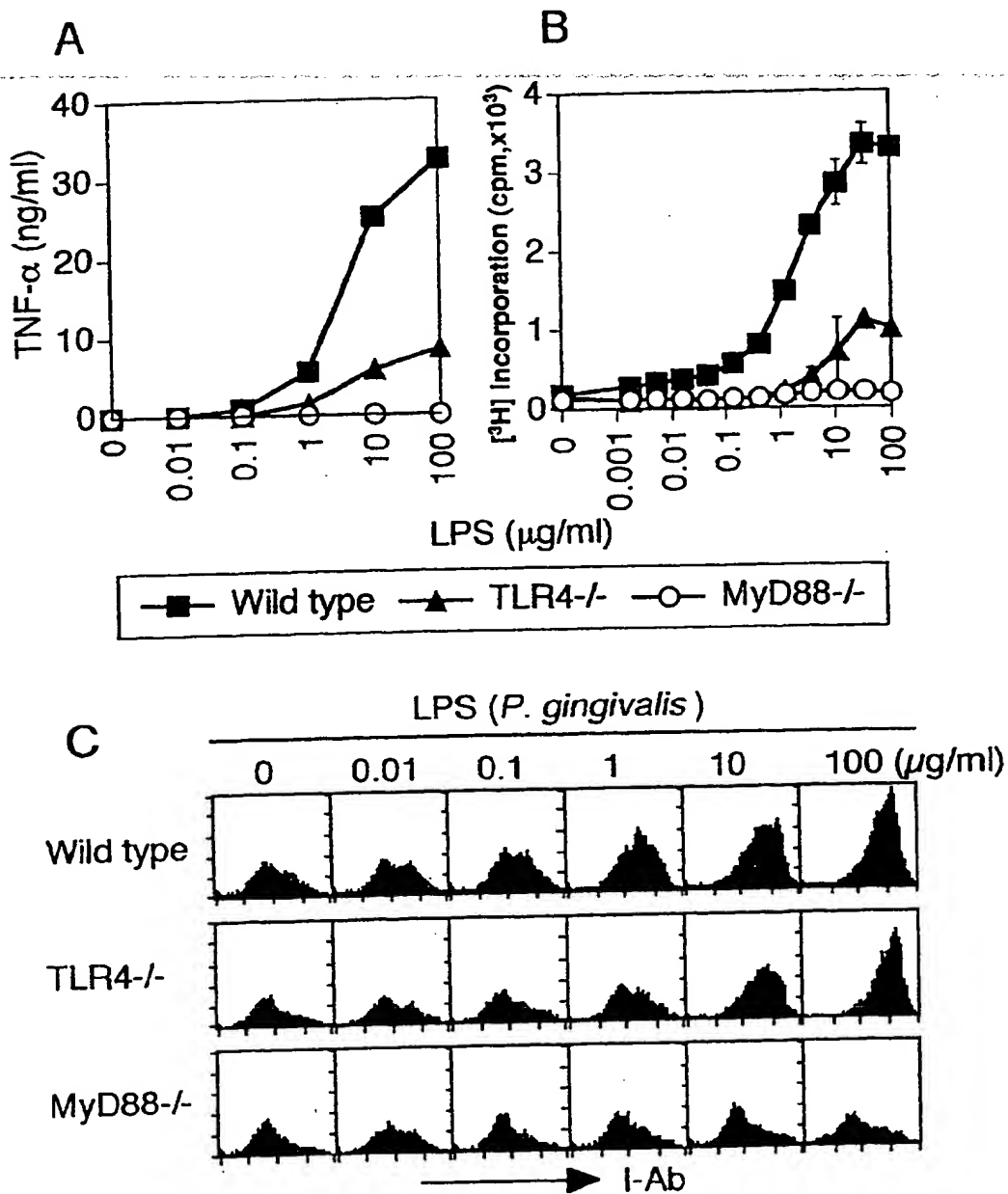
【図8】



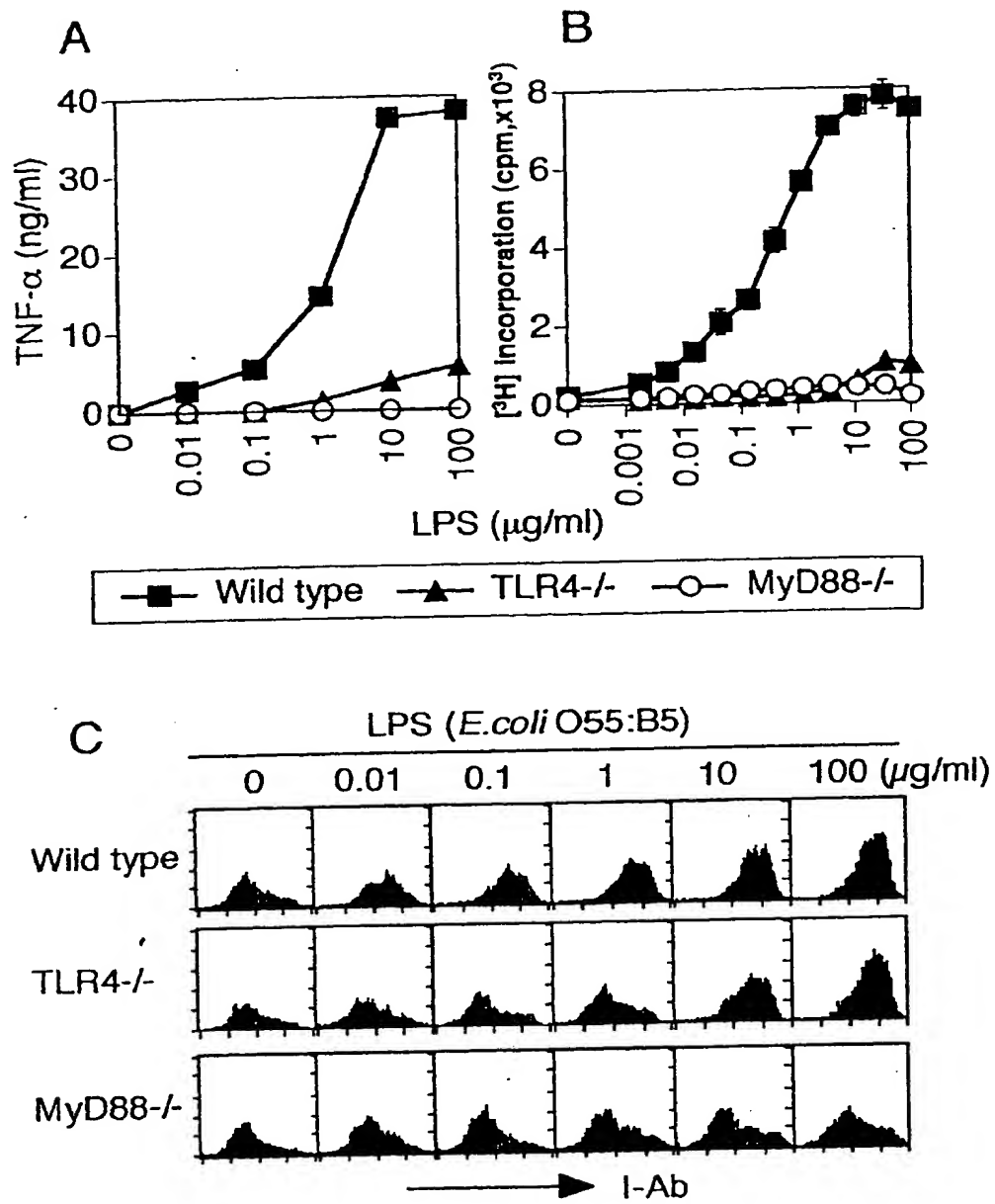
【図 9】



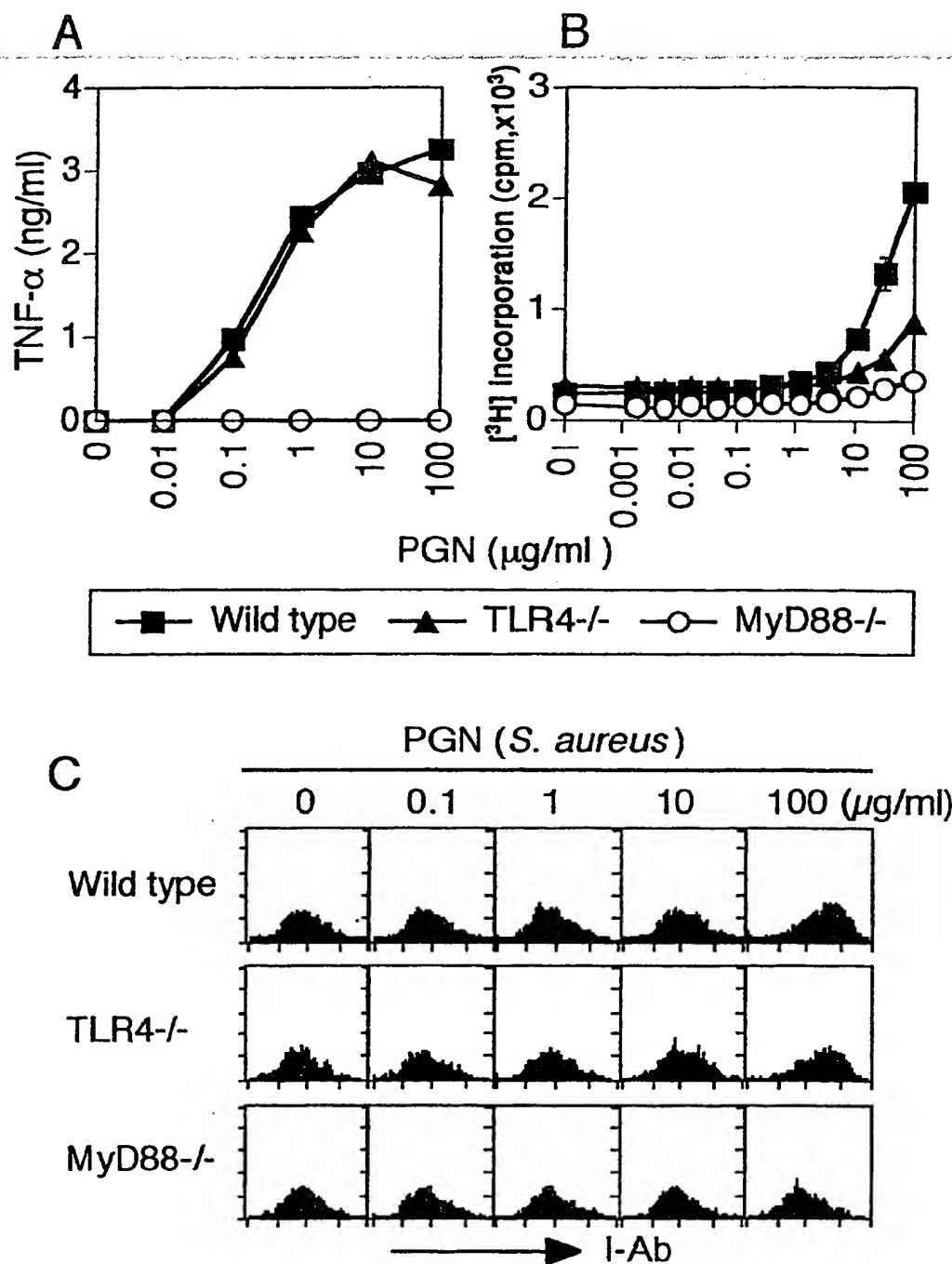
【図 10】



【図 11】

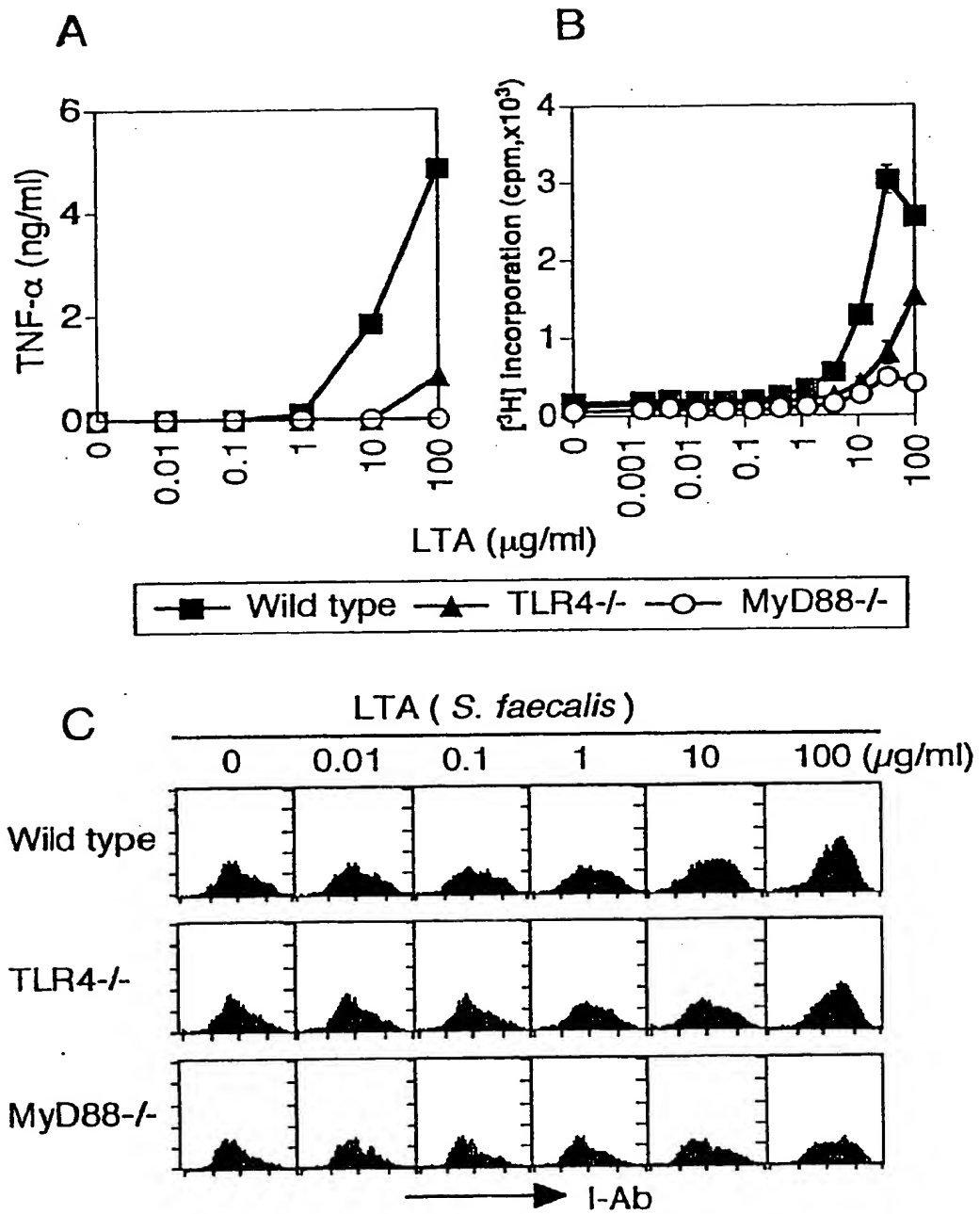


【図 1 2】

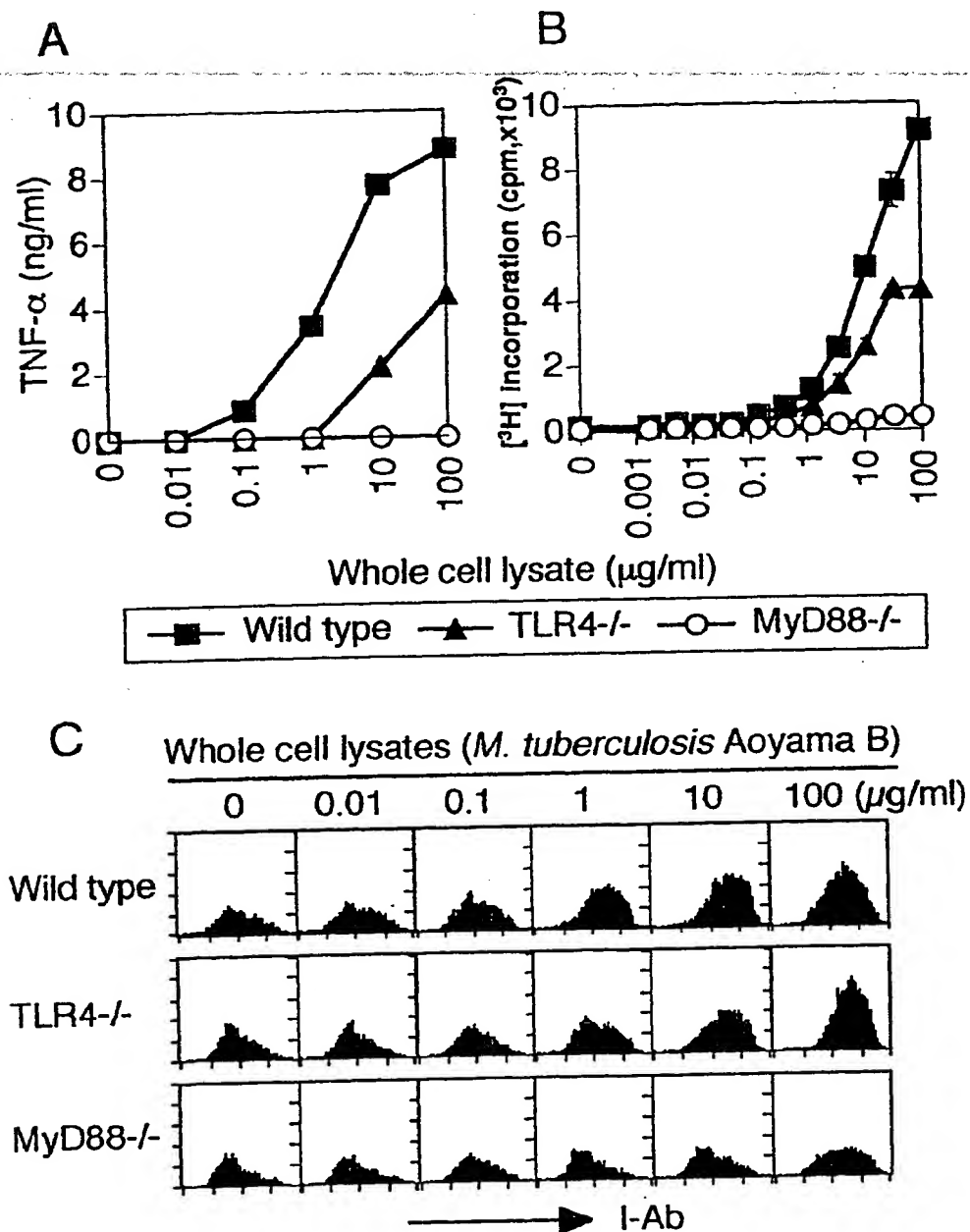




【図 1 3】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 被検物質のエンドトキシン活性や、I L - 1 活性や、I L - 1 8 活性を評価することができる骨髓細胞分化初期応答 (M y D 8 8) 遺伝子機能が欠損したノックアウトマウス等のM y D 8 8 遺伝子機能が欠損した非ヒト動物や、エンドトキシンやペプチドグリカン等の細菌細胞壁成分に対して不応答性であるノックアウトマウスを提供すること。

【解決手段】 M y D 8 8 遺伝子機能が欠損したノックアウトマウス及び野生型マウスに被検物質を投与して、該被検物質のエンドトキシン活性、I L - 1 活性、I L - 1 8 活性を評価することができる細菌細胞壁成分に対して不応答性のノックアウトマウスを作製する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

- |          |                 |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1998年 2月24日     |
| [変更理由]   | 名称変更            |
| 住 所      | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名      | 科学技術振興事業団       |